

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12P 21/08, G01N 33/577, 33/53 // C12N 15/06 (C12P 21/08 C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 93/25701 (43) 国際公開日 1993年12月23日 (23.12.1993)																																																																																				
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/00768 (22) 国際出願日 1993年6月8日 (08. 06. 93) (30) 優先権データ 特願平4/174786 1992年6月9日 (09. 06. 92) JP 特願平4/283961 1992年9月29日 (29. 09. 92) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヤマサ醤油株式会社 (YAMASA CORPORATION) [JP/JP] 〒288 千葉県銚子市新生町二丁目10番1号 Chiba, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 井上 武 (INOUE, Takeshi) [JP/JP] 〒289-05 千葉県香取郡干潟町真成1927番地 Chiba, (JP) 松浦栄次 (MATSUURA, Eiichi) [JP/JP] 〒288 千葉県銚子市上野町285-24 Chiba, (JP) 黒木由夫 (KUROKI, Yoshio) [JP/JP] 〒064 北海道札幌市中央区南六条西18丁目3番15号 Hokkaido, (JP) 秋野豊明 (AKINO, Toyooki) [JP/JP] 〒063 北海道札幌市西区西野一条4丁目4番1号 Hokkaido, (JP) 阿部庄作 (ABE, Shosaku) [JP/JP] 〒001 北海道札幌市北区新川三條5丁目4-1 Hokkaido, (JP)	(74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), PT (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書																																																																																					
(54) Title : MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HUMAN LUNG SURFACTANT APOPROTEIN D AND USE THEREOF																																																																																						
(54) 発明の名称 ヒト肺サーファクタントAが蛋白Dに対するモノクローナル抗体およびその用途																																																																																						
<div style="text-align: center;"> α </div> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">7</td> <td style="text-align: center;">8</td> <td style="text-align: center;">9</td> <td style="text-align: center;">対照</td> <td style="text-align: right;">a ... control</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="11" style="text-align: center;"> </td> </tr> <tr> <td>94 kDa</td> <td>▷</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>67 kDa</td> <td>▷</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>43 kDa</td> <td>▷</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>30 kDa</td> <td>▷</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>20 kDa</td> <td>▷</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>				1	2	3	4	5	6	7	8	9	対照	a ... control													94 kDa	▷											67 kDa	▷											43 kDa	▷											30 kDa	▷											20 kDa	▷										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	対照	a ... control																																																																											
94 kDa	▷																																																																																					
67 kDa	▷																																																																																					
43 kDa	▷																																																																																					
30 kDa	▷																																																																																					
20 kDa	▷																																																																																					
(57) Abstract A monoclonal antibody which specifically reacts with human lung surfactant apoprotein D has been successfully obtained. It has become possible to diagnose respiratory system diseases by specifically detecting or determining human lung surfactant apoprotein D with the use of the antibody.																																																																																						

(57) 要約

ヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dに特異的に反応するモノクローナル抗体を取得することに成功した。該抗体を使用して、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dを特異的に検出または測定することによる呼吸器疾患の診断が可能となった。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェコスロヴァキア	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド
BB	バルバドス	DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BF	ブルキナ・ファソ	FI	フィンランド	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BG	ブルガリア	ES	スペイン	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SE	スウェーデン
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	SU	ソビエト連邦
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	TD	チャド
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	TG	トーゴ
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	US	米国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ベトナム

明 細 書

ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D に対する
モノクローナル抗体およびその用途

5

技術分野

本発明は、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D に特異的に結合するモノクローナル抗体およびその用途に関するものである。

10 背景技術

肺は管腔臓器であり、直接外気に接する肺胞の表面は肺胞被覆層と呼ばれる外膜で被われている。肺胞被覆層の主成分はリン脂質に富んだ肺表面活性物質（肺サーファクタント）である。

- 15 肺サーファクタントはリン脂質（主成分はジパルミトイルホスファチジルコリン：DPPCとホスファチジルグリセロール：PGである）と蛋白質（約10%含有）からなるリポ蛋白であり、肺胞の空気-液体界面の表面にリン脂質が配列して肺胞の表面張力を低下させる
20 ように作用している。このため、たとえば羊水中の肺サーファクタント量は胎児の肺の成熟度を反映するものと考えられている。

- 肺サーファクタントの蛋白質部分は肺サーファクタントアポ蛋白（現在まで、肺サーファクタントアポ蛋白A、
25 同B、同Cおよび同Dの4種の存在が知られている）と

呼ばれ、肺サーファクタント機能の発現、代謝調節、生体防御機構などにおいて重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。

肺サーファクタントが関与する疾患としては新生児呼吸窮迫症候群（IRDS）、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）などが報告されている。IRDSの新生児は、肺胞中の肺サーファクタント含量が低下して肺胞が虚脱するために安定した呼吸機能が維持できなくなる。

したがって、分娩前に羊水中の肺サーファクタント含量を測定し、生まれてくる胎児がIRDSであるか否かを判断し、もし胎児がIRDSである場合には出生後直ちにサーファクタントのリボソーム製剤などを投与することが可能である。

従来、羊水中の肺サーファクタントの量を測定する方法としては、レシチンとスフィンゴミエリンの比（L/S比）の測定やDPPCの量の測定など、リン脂質に着目した方法であったが、これらの方法は疾患との相関性が低く、定量性に欠け、操作性に難があるなどの種々の問題点を有し、満足できる方法ではなかった。

リン脂質に着目した方法の問題点を解決するために肺サーファクタントの蛋白質部分、すなわち肺サーファクタントアポ蛋白に着目し、この蛋白質に対する抗体を用いて肺サーファクタントを検出または測定しようとする試みも報告されている（たとえば、特開昭62-64956号、特開平4-9665号、WO89/02075

号、WO 89 / 0 1 6 2 4 号など参照)。

- ヒト肺サーファクタントアポ蛋白は、上述したように A ～ D の 4 種類の存在が知られている。肺サーファクタントアポ蛋白 A は分子量 28 ～ 38 kDa (還元条件) の
- 5 親水性の蛋白質で、主に肺サーファクタントの代謝調節に関与しており、肺サーファクタントアポ蛋白 B および C はそれぞれ分子量 8 kDa (還元条件) 及び 3 ～ 4 kDa (還元条件) の疎水性の蛋白質で、主に肺サーファクタント自体の機能発現に関与している。
- 10 肺サーファクタントアポ蛋白 D は分子量 43 kDa (還元条件) の親水性蛋白質で、その機能は十分に解明されていないものの、肺サーファクタントアポ蛋白 A ～ C とは異なる作用を有するであろうことが報告されている。また、肺サーファクタントアポ蛋白 D の羊水中での経時
- 15 変化も肺サーファクタントアポ蛋白 A のそれとは相違し、その機能との関連から肺組織中での肺サーファクタントアポ蛋白 D の検出や血中、気管支肺胞洗浄中、および羊水中の肺サーファクタントアポ蛋白 D の定量および経時変化を正確に測定することに興味をもたれている。
- 20 よって、本発明の目的はヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D を特異的に検出または測定することのできるモノクローナル抗体を提供することであり、他の目的は得られたモノクローナル抗体を利用してヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D を特異的に検出または測定するための方法
- 25 法およびキットを提供することにある。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成すべく研究を重ねた結果、上記目的に合致したモノクローナル抗体を効率よく取得することに成功し、このモノクローナル抗体を使用
5 することによりヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dを特異的に検出または測定できることを知見し、本発明を完成させた。

したがって、本発明はヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dに対して特異的に結合するモノクローナル抗体に関するものである。
10

また、本発明は上記モノクローナル抗体を測定試薬として使用することを特徴とするヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dの測定法及びキットに関するものである。

さらに、本発明は上記モノクローナル抗体を抗体試薬
15 として使用することを特徴とするヒト肺組織中におけるヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dの存在を検出するための方法及びキットに関するものである。

図面の簡単な説明

図1は、モノクローナル抗体のイムノブロッティング
20 法による特異性を示したものである。

図2は、モノクローナル抗体(6B2)の反応性を示したものである。

図3は、モノクローナル抗体(7C6)の反応性を示したものである。

25 図4は、モノクローナル抗体(6B2及び7C6)の

イムノブロッティング法における交叉反応性を示したものである。

図 5 は、モノクローナル抗体（6 B 2 及び 7 C 6）のサンドイッチ E L I S A における交叉反応性を示したものである。

図 6 は、サンドイッチ E L I S A における検量線を示したものである。

図 7 は、サンドイッチ E L I S A における希釈試験の結果を示したものである。

10 図 8 は妊婦羊水中の肺サーファクタントアポ蛋白 D（S P - D）濃度を、サンドイッチ E L I S A で測定した結果を示したものである。

図 9 は、肺胞蛋白症患者及び健常人の気管支肺胞洗浄液中の S P - D 濃度を、サンドイッチ E L I S A で測定した結果を示したものである。

図 1 0 は、各種呼吸器疾患（肺扁平上皮癌、肺腺癌、肺小細胞癌、サルコイドーシス、肺結核、肺気腫、肺炎）を伴う患者及び健常人の血清中 S P - D 濃度を、サンドイッチ E L I S A で測定したものである。

20 図 1 1 は、各種呼吸器疾患（特発性間質性肺炎、膠原病合併間質性肺炎、肺胞蛋白症、気管支喘息、気管支拡張症、汎細気管支炎、ハシモト病、バセドウ病）を伴う患者及び健常人の血清中 S P - D 濃度を、サンドイッチ E L I S A で測定した結果を示したものである。

25 図 1 2 は、モノクローナル抗体（6 B 2）を用いて肺

腺癌組織を免疫染色した時の結果を示したものである。

図 1 3 は、モノクローナル抗体（6 B 2）を用いて肺扁平上皮癌組織を免疫染色した時の結果を示したものである。

5 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳述する。

1. モノクローナル抗体

(1) 特性

本発明のモノクローナル抗体はヒト肺サーファクタント
10 トアポ蛋白 D に対して特異的に結合するモノクローナル
抗体であって、その他の特性は何ら制限されるものでは
ないが、典型的には下記の特性を有する。このようなモノ
クローナル抗体を使用することにより、サンプル中の
ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D を特異的に検出また
15 は測定することが初めて可能となったのである。

① 特異性

後述の実施例に示すイムノブロッティング法で抗体の
特異性を調べると、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D
に特異的に反応する。

20 ② 反応性

後述の実施例に示す E L I S A 法により抗体の反応性
を調べると、抗体の濃度に依存してヒト肺サーファク
タントアポ蛋白 D と反応する。

③ 交叉性

25 後述の実施例に示すイムノブロッティング法およびサ

ンドイッチ E L I S A 法により抗体の反応性を調べると、ヒト由来の肺サーファクタントアポ蛋白 A、同 B 及び同 C とは実質的に反応しないか、反応する場合でもヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D の測定上なんら影響を及ぼさない。

④種特異性

後述の実施例に示すイムノブロッティング法およびサンドイッチ E L I S A 法により抗体の反応性を調べると、他の動物（ラット）由来の肺サーファクタントアポ蛋白 D とは実質的に反応しないか、反応する場合でもヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D の測定上なんら影響を及ぼさない。

(2) 製造法

上述の本発明のモノクローナル抗体は公知の方法を適宜応用することにより製造することができる。

使用する免疫原はヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D であるが、このものは例えば、ヒト気管支肺胞洗浄液から、好ましくは肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液から Persson らの方法（J. Biol. Chem. 265, 5755, 1990）などにより調製することができる。免疫原の精製度は特に制限されない。

また、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D のアミノ酸配列の一部に対応したペプチドを公知の方法により化学的に調製し、これを免疫原として使用してもよい。合成したペプチドの抗原性が乏しい場合には、ウシ血清アル

ブミン、キーホールリンペットヘモシアニンなどのハプ
テン抗原の抗体製造に常用されている高分子担体との複
合体を免疫原として用いるのが好ましい。さらに、公知
のDNA組換え手法を用いて調製した組換え型ヒト肺サ
5 ーファクタントアポ蛋白Dを免疫原として使用してもよ
い。

免疫原を投与する動物としては、ウシ、ウマ、ヒツジ、
ヤギ、ラット、マウス、モルモット、イヌ、ブタ、ウサ
ギ、サル、ハト、ニワトリなどいずれであってもよく、
10 特にマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギなどが
使用上好都合である。

このような動物への免疫原の投与は常法に従って行え
ばよく、たとえば、完全フロインドアジュバンド、不完
全フロインドアジュバンド、ミョウバンアジュバンド、
15 水酸化アルミニウムアジュバンド、百日咳菌アジュバン
ドなどの各種アジュバンドと上述の免疫原とのエマルジ
ョンを調製し、これを上記動物の静脈内、腹腔内、皮下
または皮内に投与すればよい。

投与量は、動物としてウサギ、モルモットを使用する
20 場合には蛋白量として0.01～10mg/匹、またはマウ
ス、ラットを使用する場合には、0.001～1mg/匹程
度が好適である。

初回投与後、1～4週間おきに1～5回程度の上記と
同様の追加免疫を行うことにより、動物体内でヒト肺サ
25 ーファクタントアポ蛋白Dに対する抗体産生を誘導する。

次に、抗体産生を誘導した動物から脾細胞、リンパ節細胞、末梢血リンパ球などの抗体産生細胞を常法により取得する。

抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞としては、
5 マウス、ラット、ヒトなどの種々の動物に由来し、当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態のみ生存できる性質を有するものが好ましい。通常、8-
10 アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株はヒポキサンチン-グアニンホスフォリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) を欠損し、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (HAT) 培地に生育できない。また細胞の性質として
15 免疫グロブリンを分泌しない、いわゆる非分泌型の細胞株であることが好ましい。

ミエローマ細胞株の具体例としては、P 3 x 6 3 A g
8 (A T C C T I B - 9) (Nature, 2 5 6, 4 9 5
- 4 9 7 (1 9 7 5))、P 3 x 6 3 A g 8 U. 1 (P
20 3 U 1) (A T C C C R L - 1 5 9 7) (Current
Topics in Microbiology and Immunology, 8 1, 1 -
7 (1 9 7 8))、P 3 x 6 3 A g 8. 6 5 3 (A T C C
C R L - 1 5 8 0) (J. Immunology, 1 2 3, 1 5
4 8 - 1 5 5 0 (1 9 7 9))、P 2 / N S I / 1 - A
25 g 4 - 1 (A T C C T I B - 1 8) (European J.

Immunology, 6, 511-519 (1976))、Sp
2/0-Ag14 (ATCC CRL-1581)
(Nature, 276, 269-270 (1978)) などの
マウスミエローマ細胞株、210.RCY.Ag1.
5 2.3 (Y3-Ag1.2.3) (ATCC CRL-
1631) (Nature, 277, 131-133 (197
9)) などのラットミエローマ細胞株、U-266-A
R1 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 5429
(1980))、GM1500 (Nature, 288, 48
10 8 (1980))、KR-4 (Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A., 79, 6651 (1982)) などのヒトミエ
ローマ細胞株を例示することができる。

細胞融合にあたっては、抗体産生細胞に適合したミエ
ローマ細胞を選定する。

- 15 細胞融合は、イーグルの最少必須培地 (MEM)、ダ
ルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、RPMI-1
640 培地などの動物細胞培養用培地中で $10^6 \sim$
 10^8 細胞/ml のミエローマ細胞と抗体産生細胞を混合
比 1 : 4 ~ 10 に混合し、37℃で 1 ~ 10 分間細胞同
20 士を接触させることにより効率よく融合を行うことがで
きる。細胞融合を促進させるため、平均分子量 1,000
~ 6,000 のポリエチレングリコール (PEG)、ポリ
ビニールアルコール、センダイウィルスなどの融合促進
剤を使用することができる。また、電気パルスを利用し
25 た市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエロー

マ細胞を融合させることもできる。

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する手段としては、選択的培地における細胞の選択的増殖を利用する方法を用いることができる。たとえば、細胞懸濁液を15%ウシ胎児血清(FCS)含有RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロプレート上に $10^3 \sim 10^6$ 細胞/ウェル程度まき、各ウェルに選択培地(たとえば、HAT培地など)を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。ミエローマ細胞として8-アザグアニン耐性株、選択培地としてHAT培地を用いた場合は、未融合のミエローマ細胞は培養10日目ぐらいまでに死滅し、正常細胞である抗体産生細胞もインビトロ(*in vitro*)では長期間生育できないので、培養10~14日目から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

ヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの検索は、酵素免疫測定法(EIA、ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)などによって行うことができる。たとえば、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dを吸着させた96ウェルELISA用マイクロプレートにモノクローナル抗体を含む培養上清を添加してヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dと反応させ、次いで結合した特異抗体に酵素標識抗免疫グロブリン抗体を反応させるか、あるいはビオチン標識抗免疫グロブリン抗体を反応させたのちア

ビジンD-酵素標識体を反応させ、次いでいずれの場合とも各ウェルに酵素基質を加えて発色させる。ヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dを固定化したウェルのみで発色する培養上清を選別することにより、ヒト肺サーファ

- 5 クタントアポ蛋白Dと特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを検索することができる。

また、上記スクリーニングにおいて使用するヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dとしては精製度の高いものが好ましく、たとえば、90%以上の精製度のものを使用

10 することにより本発明のモノクローナル抗体を効率的にスクリーニングすることができる。

ハイブリドーマのクローニングは、限界希釈法、軟寒天法、フィブリンゲル法、蛍光励起セルソーター法などにより行うことができる。

- 15 このようにして取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を産生する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法などが採用されうる。

細胞培養法においては、ハイブリドーマを10~15% FCS含有RPMI-1640培地、無血清培地など

20 の動物細胞培養用培地中で通常の方法で培養し、その培養上清液から抗体を取得することができる。

腹水から回収する方法では、ハイブリドーマと腫瘍組織適合性が一致する動物に、プリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン)などの鉱物油を腹腔

25 内に投与した後、たとえばマウスの場合にはハイブリド

ーマを約 10^6 細胞／匹腹腔内投与する。ハイブリドーマは 10 ～ 18 日ほどで腹水腫瘍を形成し、血清および腹水中に高濃度に抗体を生産する。

- 5 抗体の精製が必要とされる場合には、硫安塩析法、D E A E セルロースなどの陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、プロテイン A - セファロー
- スなどを用いるアフィニティークロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択し、組み合わせることにより精製することができる。

10 2. 測定法及びキット

本発明の測定法は上述の本発明のモノクローナル抗体を試薬として使用することを特徴としており、測定原理、条件等には制限されない。

- 15 反応様式による分類として、競合反応法と非競合反応法（イムノメトリックアッセイ）が知られており、本発明においてはいずれの方法も採用できる。

- 20 検出方法による分類として、抗原抗体反応の結果を直接検出する非標識法（ネフェロメトリーなど）と、なんらかのマーカを使用して検出する標識法が知られているが、本発明ではいずれの方法によってもよい。

B F 分離を行う必要のあるヘテロジニアス法と必要のないホモジニアス法が知られており、本発明にはいずれの方法を適用してもよい。

- 25 反応相による分類として、全反応が液相で行われる液相法と免疫反応の相手を固相化して反応を行う固相法が

知られているが、本発明においてはいずれの方法も採用できる。

これら、公知の一般法の中から、本発明の測定法の目的に適合する方法を適宜選択すればよい。

5 なお、一般的方法の詳細についてはたとえば以下の文献に詳細に記載されている。

①入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(株)講談社、昭和54年5月1日発行)

②石川英治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(株)

10 医学書院、1982年12月15日発行)

③臨床病理 臨時増刊 特集第53号「臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」(臨床病理刊行会、1983年発行)

④「バイオテクノロジー事典」(株)シーエムシー、

15 1986年10月9日発行)

⑤「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 70」

(Immunochemical techniques (Part A))

⑥「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 73」

(Immunochemical techniques (Part B))

20 ⑦「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 74」

(Immunochemical techniques (Part C))

⑧「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 84」

(Immunochemical techniques (Part D : Selected Immunoassay))

25 ⑨「Methods in ENZYMOLOGY Vol. 92」

(Immunochemical techniques (Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))

〔⑤～⑨はアカデミックプレス社発行〕

また、本発明の測定法で使用する本発明のモノクロー
ナル抗体の使用態様は採用する測定法に応じたものに適
5 宜誘導すればよい。具体的には標識化抗体、固相化抗体
などを例示できる。

使用する抗体は抗体そのものであってもよいが、非特
異的な吸着を防止する意味から抗体の活性フラグメント
10 を使用するのが好ましい。

抗体の活性フラグメントは、抗体の特徴を保持するも
の（たとえば、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab などの各種フラ
グメント）であればいずれのものであってもよい。これ
ら活性フラグメントの調製は、精製抗体をパパイン、ペ
15 プシン、トリプシンなどのプロテアーゼを用いて限定分
解する方法など公知の方法を適用して行うことができる
（たとえば「免疫生化学研究法（続生化学実験講座5
）」、日本生化学会編、89頁（1986年）参照）。

抗体に結合させる標識剤としては、放射性同位体（た
20 とえば ^{32}P 、 3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I など）、酵素（たとえ
ば β -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリ
ホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナ
ーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキ
シダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミンオキシ
25 ダーゼなど）、補酵素・補欠分子族（たとえば、FAD、

- F M N、A T P、ビオチン、ヘムなど)、フルオレセイン誘導体(たとえば、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレセインチオフルバミルなど)、ローダミン誘導体(たとえば、テトラメチルローダミンBイソチオシアネートなど)、ウムベリフェロンおよび1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸などの蛍光色素、ルミノール誘導体(たとえば、ルミノール、イソルミノール、N-(6-アミノヘキシル)-N-エチルイソルミノールなど)などを用いることができる。抗体またはその活性フラグメントと標識剤との結合は、成書(たとえば、「続生化学実験講座5免疫生化学研究法」(株)東京化学同人、(1986年発行)第102~112頁)に記載されているような公知の方法から適宜選択して実施すればよい。
- 15 抗体を固定するための担体物質の材質としては、たとえばポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成有機高分子化合物、デキストラン誘導体(セファデックスなど)、アガロースゲル(セファロース、バイオゲルなど)、セルロース(ペーパーディスク、濾紙など)などの多糖類、ガラス、シリカゲル、シリコンなどの無機高分子化合物が挙げられ、これらはアミノ基、アミノアルキル基、カルボキ
- 20
- 25

シル基、アシル基、水酸基などの官能基を導入したものであってもよい。なお、担体物質の材質は蛋白質の結合能の低いものが好ましく、このような材質としては未処理のポリスチレン、ポリ塩化ビニルが例示される。

- 5 担体物質の形状は、平板状（マイクロタイタースプレートの、ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）、カプセル状、小胞体状などが例示され、測定法
- 10 た、リボソーム（単層または多層の脂質膜）なども抗体を固定するための担体物質として使用することもできる。

- モノクローナル抗体と担体物質との結合は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法など公知の方法（たとえば、「固定化酵素」（千畑一郎編、昭和50
- 15 年3月20日、（株）講談社発行）参照）を採用することができる。とりわけ、物理的吸着法は簡便である点で好ましい。また、上記結合は、直接行ってもよく、両物質の間に他の物質を介して行ってもよい。

- 測定対象のサンプルとしては、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dを含有するものであれば特に制限されない。
- 20 たとえば、羊水、肺胞洗浄液、血液、血清、血漿などを例示することができる。

- 上記測定法に使用するキットは、本発明のモノクローナル抗体をキットの構成試薬の1つとして含有すること
- 25 を特徴とするものであり、キットの他の試薬構成は採用

した測定法によって異なっているいてもよい。

競合反応法に基づくキットの場合には、たとえば以下の試薬構成をとりうる。

- ① 固相化抗原（抗体）
- 5 ② 標識化抗体（抗原）溶液
- ③ 既知濃度の抗原液

また、サンドイッチ法に基づくキットの場合には、たとえば以下の試薬構成をとりうる。

- ① 固相化第一抗体
- 10 ② 第二抗体溶液
- ③ 標識化抗イムノグロブリン抗体溶液
- ④ 既知濃度の抗原液

- 上記のキットにおいて、「抗体」とは本発明のモノクローナル抗体であり、「抗原」とはヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dであることはいうまでもない。また、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dは多価抗原であり、サンドイッチ法に基づくキットの場合には「第一抗体」と「第二抗体」はヒト肺サーファクタントアポ蛋白D上の同一の抗原決定基を認識するものであってもよく、異なる抗原決定基を認識するものであってもよい。
- 20

また、サンドイッチ法に基づくキットの変型としては、たとえば以下の試薬構成をとりうる。

- ① 固相化第一抗体
- ② 標識化第二抗体溶液
- 25 ③ 既知濃度の抗原液

3. 検出法及びキット

本発明の検出法は、肺組織中の肺サーファクタントア
ポ蛋白Dを検出するに当たり、前述の本発明のモノクロ
ーナル抗体を抗体試薬として使用することを特徴として
5 いる。したがって、標識剤、抗体の標識方法及び標識化
した抗体を使用した検出方法は免疫組織診断法において
常用されている方法をそのまま適用することができる。

すなわち、標識剤としては上述した放射性同位体、酵
素、補酵素・補欠分子族、蛍光色素、ルミノール誘導体
10 などを使用できる。このような標識剤を結合させる抗体
は、抗体自体でもよく、そのフラグメントであってもよ
い。抗体またはそのフラグメントと上記標識剤との結合
は常法によって行うことができる。また、抗体の標識は、
標識化抗イムノグロブリン抗体などを用いて間接的に行
15 なってもよい。

このようにして調製した標識化抗体を常法にしたがっ
て肺組織標本に作用させ、抗体に結合させた標識剤を視
覚化することにより肺組織中の肺サーファクタントアポ
蛋白Dを検出することができる。

20 上記検出法において標識剤として酵素を用いた場合、
キットとしては下記の構成試薬をとりうる。

①酵素標識化抗体

②基質溶液

また、上記キットの変形としてビオチン-アビジン法
25 を採用すれば、キットは下記の試薬から構成される。

① ビオチン化抗体

② アビジン化酵素

③ 基質溶液

なお、上記のキットにおいて、「抗体」とは本発明の
5 モノクローナル抗体であることはいうまでもない。

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明する。

実施例 1 ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D (SP-D) に対するマウスモノクローナル抗体の作製

① モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

10 公知の方法 (Persson, A. et al, J. Biol. Chem. 265, 5755, (1990)) により調製したヒト SP-D を生理食塩水に溶解させ (0.4 mg/ml)、完全フロイントアジュバンドと 1 : 1 の比率で混合してエマルジョンとしたものを BALB/c マウス (雌、6 週令)
15 の腹腔内に 20 μ g / 100 μ l 投与 (i.p.) して初回免疫とした。初回免疫後、2 週間おきに数回、同様の方法で免疫 (i.p.) した後、最終免疫としてヒト SP-D の生理食塩水溶液をマウスの尾静脈に 5 μ g / 200 μ l 投与 (i.v.) した。

20 最終免疫から 3 日後にマウスの脾臓を摘出し、RPMI-1640 培地で洗浄して脾細胞浮遊液を調製した。同時にマウスミエローマ P3x63Ag8U1 (P3U1) (ATCC CRL-1597) を RPMI-1640 培地で洗浄し、脾細胞と P3U1 を 10 : 1 で混合
25 した後、遠心分離して得たペレットに 50% ポリエチレ

ングリコール (PEG) 1000 含有 RPMI-1640 培地溶液 1 ml を徐々に加えて細胞融合を行った。さらに、RPMI-1640 培地溶液を加えて 10 ml とし、遠心分離して得たペレットを 1% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 RPMI-1640 培地に P3U1 として 3×10^4 細胞 / 0.1 ml となるように懸濁させ、96 ウェルマイクロタイタープレートに各ウェル 0.1 ml ずつ分注した。翌日、ヒポキサンチン-チミジン-アミノプテリン含有 RPMI-1640 培地 (HAT 培地) を 0.1 ml 添加し、その後 3~4 日ごとに培地の半分量を新しい HAT 培地で交換した。

融合から 14 日目にハイブリドーマのスクリーニングをした。すなわち、あらかじめヒト SP-D ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$) をコートし、25% ブロックエース (大日本製薬社製) 含有 PBS でブロッキングした 96 ウェルマイクロタイタープレートに培養上清 $50 \mu\text{l}$ を添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS $200 \mu\text{l}$ で 3 回洗浄した後、ビオチン化抗マウス IgG (ベクター社製) 溶液 $50 \mu\text{l}$ を加えて室温でさらに 1 時間反応させた。反応後、PBS で 3 回洗浄し、アビジン D-ペルオキシダーゼ (ベクター社製) 溶液 $50 \mu\text{l}$ を加えて室温で 30 分間反応させた。さらに PBS で同様に洗浄し、基質溶液 (4-アミノアンチピリン ($0.25 \text{ mg} / \text{ml}$)、フェノール ($0.25 \text{ mg} / \text{ml}$)、 0.425 M 過酸化水素含有) $200 \mu\text{l}$ を加えて室温で反応させ、 550 nm の吸光度を測

定してヒトSP-Dに特異的に反応する抗体を検出し、特異抗体産生ハイブリドーマを選別した（表1）。

表 1

5	抗原	特異抗体 陽性ウェル数	細胞増殖 ウェル数	全ウェル数
	ヒト SP-D	9 4	6 6 0	9 4 0

このようにして選別した各ハイブリドーマをさらに限
10 界希釈法を用いてクローニングし、ヒトSP-Dに対し
極めて特異性の高い抗体を産生するハイブリドーマ9株
（1G11、3E4、3H4、5A4、6B2、7A1
0、7C6、9E1、10H11）を樹立した。

②モノクローナル抗体の調製および精製

15 これら9種の樹立株細胞を、あらかじめプリスタン0.
5mlで処理したマウスの腹腔内へ 3×10^6 個ずつ投与
し、約2週間後に腹水を採取した。次に上記の腹水中か
らIgGを精製するためプロテインA-セファロースカラ
ムによるアフィニティークロマトグラフィーを行った。
20 まず、プロテインA-セファロース（ファルマシア社
製）20mlを 1.5×20 cmのガラス製カラムに充填し、
3M塩化ナトリウムを含む1.5Mグリシン緩衝液（pH8.
9）にて平衡化した。次に、先の腹水を等量の同グリシ
ン緩衝液で2倍希釈してカラムに加え充分量の同グリシ
25 ン緩衝液で非吸着蛋白を洗浄除去した後、吸着したIgG

を0.1 Mクエン酸緩衝液 (pH3.0) にて溶出した。こうして得られたIgG 画分を変性を避けるため速やかにPBSに対して1晩透析した。

実施例2 モノクローナル抗体の性質の解析① (クラス、 5 タイプの検索)

ヒトSP-D ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$) をコートし、25%ブロックエース (大日本製薬社製) 含有PBSでブロッキング処理を施してある96ウェルマイクロタイタープレートにハイブリドーマの培養上清または精製モノクロー
10 ナル抗体溶液を添加し、MonoAb-ID EIA キット (Zymed 社製) を用いて抗体のクラス、タイプの検索を行った。結果は表2に示す通りである。

表 2

15	クローン	IgG クラス/タイプ
	1G11	IgG1 / κ
	3E4	IgG1 / κ
20	3H4	IgG1 / κ
	5A4	IgG2a / κ
	6B2	IgG1 / κ
	7A10	IgG1 / κ
	7C6	IgG1 / κ
25	9E1	IgG1 / κ
	10H11	IgG1 / κ

実施例3 モノクローナル抗体の性質の解析② (モノク ローナル抗ヒトSP-D抗体の抗原特異性)

ハイブリドーマ（1 G 1 1、3 E 4、3 H 4、5 A 4、
6 B 2、7 A 1 0、7 C 6、9 E 1、1 0 H 1 1）の産
生するモノクローナル抗体（抗体名はそれを産生するハ
イブリドーマ名と同じである）の抗原特異性の確認は S
5 D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（S D S - P
A G E）を用いたイムノブロッティング法および酵素免
疫測定法（E L I S A）により行った。

(A) イムノブロッティング法による特異性の解析

S D S - P A G E は Lamli の方法（Nature, 2 2 7 :
10 6 8 0, 1 9 7 2）に準じ行った。イムノブロッティ
ング法の基本操作は次の通りである。すなわち、S D S -
P A G E によって得られた分離ゲルをニトロセルロース
膜に乗せ、6 0 V、1 2 時間通電してニトロセルロース
膜に蛋白を転写した。こうして得られたニトロセルロー
15 ス膜を試料の泳動ラインに沿って短冊上に切断し、一部
はアミドブラックを用いて蛋白を染色した。他の膜は 0.
5 % Triton X-1 0 0 及び 2 % スキムミルク含有 P B S
に 3 7 °C、1 時間浸してブロッキング処理を行った後、
P B S で適宜希釈したモノクローナル抗体溶液を室温で
20 1 時間反応させた。P B S で充分洗浄した後、ペルオキ
シダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間反応させ
た。さらに、ニトロセルロース膜を同様に洗浄し、基質
溶液（カラーディベロップ（バイオラッド社製）3 0
mg、メタノール 1 0 ml、P B S 5 0 ml、3 0 % 過酸化水
25 素水 3 0 μ l 含有）と反応させ、適当に発色した時点で

水洗いをして反応を停止させた。

ヒト S P - D は、還元条件下、分子量 43 kDa を示す。
ヒト S P - D 画分を還元条件下で電気泳動し、イムノブ
ロットティング法によりモノクローナル抗体の反応特異性
5 を調べた。その結果、図 1 に示したように 9 種のモノク
ローナル抗体（レーン 1 : 1 G 1 1、レーン 2 : 3 E 4、
レーン 3 : 3 H 4、レーン 4 : 5 A 4、レーン 5 : 6 B
2、レーン 6 : 7 A 1 0、レーン 7 : 7 C 6、レーン
8 : 9 E 1、レーン 9 : 1 0 H 1 1）はいずれも分子量
410 3 kDa のヒト S P - D に極めて強い反応性を示した。

また、モノクローナル抗体（7 C 6）は調製時に派生し
たと思われる分子量約 38 kDa のヒト S P - D の分解物
に対しても極めて強い反応性を示した。

(B) E L I S A による特異性の解析

15 精製ヒト S P - D の 5 mM トリス溶液（1.0 μ g / ml、
pH 7.4）を 50 μ l ずつ 96 ウェルマイクロタイターブ
レートの各ウェルに添加し、4 $^{\circ}$ C で 1 晩放置した後、P
B S で 3 回洗浄した。0.5 % Triton 100 - X 及び 2
% スキムミルク含有 P B S 200 μ l を各ウェルに添加
20 し、室温で 1 時間放置してブロッキングを施した。P B
S で 3 回洗浄した後、モノクローナル抗体溶液 50 μ l
を入れ室温で 1 時間反応させた。P B S 200 μ l で 3
回洗浄した後、ビオチン化抗マウス IgG（ベクター社
製）溶液 50 μ l を加えて室温でさらに 1 時間反応させ
25 た。反応後、P B S で 3 回洗浄し、アビジン D - ペルオ

キシダーゼ（ベクター社製）溶液 $50 \mu\text{l}$ を加え、室温で 30 分間反応させた。さらに P B S で同様に洗浄し、基質溶液（O-フェニレンジアミン（ 0.2 mg/ml ）及び 0.425 M 過酸化水素含有 0.1 M クエン酸緩衝液 pH5.

- 5 $0.100 \mu\text{l}$ を加えて室温で反応させた後、 2 N 硫酸 $100 \mu\text{l}$ を加えて反応を停止させ、 492 nm の吸光度を測定した。図 2 及び図 3 に示すごとく、モノクローナル抗体（6 B 2 および 7 C 6）のヒト S P - D（ $1.0 \mu\text{g/ml}$ ）に対する反応性は濃度依存的であった。結果
- 10 は示していないが、他のモノクローナル抗体（1 G 1 1、3 E 4、3 H 4、5 A 4、7 A 1 0、9 E 1、1 0 H 1 1）に関しても同様の現象を確認している。

実施例 4 モノクローナル抗体の性質の解析③（モノクローナル抗ヒト S P - D 抗体の交叉反応性）

- 15 ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体（6 B 2 及び 7 C 6）のヒト S P - A およびラット S P - D に対する交叉反応性の確認を S D S - P A G E を用いたイムノブロッティング法およびサンドイッチ E L I S A により行った。

- 20 ヒトおよびラット S P - D は前述した Persson らの方法により、またヒト S P - A は Kuroki らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 5566, 1988）により調製した。

(A) イムノブロッティング法による交叉反応性の解析

- 25 ヒト S P - D 画分、ヒト S P - A 画分、ラット S P -

D画分およびヒト羊水（妊娠38週）を還元条件下で電気泳動し、イムノブロッティング法にてモノクローナル抗体の交叉反応性を調べた。

ブロッティングの結果より（レーン1：ヒトSP-D、
5 レーン2：ヒトSP-A、レーン3：ラットSP-D、
レーン4：ヒト羊水）、それぞれのモノクローナル抗体（6B2及び7C6）は分子量43kDaのヒトSP-D、ヒトSP-Dの二量体と思われる約90kDaの蛋白質及びヒト羊水中のSP-Dに対して極めて強い反応性を示した。また、モノクローナル抗体（7C6）は、ヒトSP-D調製時に派生したと思われる分子量約38kDaのヒトSP-D分解物に対しても極めて強い反応性を示した。これに対し、両モノクローナル抗体とも還元条件下で分子量約26～38kDaを示すヒトSP-Aに対しては
10 全く反応性を示さず、ヒトSP-A画分中に微量に混在すると思われる分子量43kDaのヒトSP-Dに対してのみわずかに反応した。一方、両モノクローナル抗体はラットSP-D（還元下、分子量約43kDaを示す）に対してはほとんど反応性を示さなかった（図4）。

20 (B) サンドイッチELISAによる交叉反応性の解析

本発明のモノクローナル抗体（6B2及び7C6）のヒトSP-A及びラットSP-Dに対する交叉反応性を両モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAにより調べた。サンドイッチELISAの基本操作法は
25 次の通りである。

モノクローナル抗体（6 B 2）の P B S 溶液 1 0 μ g / ml を 5 0 μ l ずつ 9 6 ウェルマイクロタイタープレート
 の各ウェルに添加し、4 $^{\circ}$ C で 1 晩放置した後、P B S
 で 3 回洗浄した。0.5 % Triton X-1 0 0 及び 2 % スキ
 5 ムミルク含有 P B S 2 0 0 μ l を各ウェルに添加し、さ
 らに室温で 1 時間放置してブロッキングを施した。P B
 S で 3 回洗浄した後、ヒト S P-D の P B S 溶液を 5 0
 μ l を添加し、4 $^{\circ}$ C で 1 晩放置した。P B S 2 0 0 μ l
 で 3 回洗浄した後、ビオチン化モノクローナル抗体（7
 10 C 6）の P B S 溶液（0.5 % Triton X-1 0 0 及び 0.1
 % スキムミルク含有）1 0 μ g / ml を 5 0 μ l 加えて室
 温で 4 時間反応させた。反応後、P B S で 3 回洗浄し、
 アビジン D-ペルオキシダーゼ（ベクター社製）溶液 5
 0 μ l を加えて室温で 3 0 分間反応させた。さらに P B
 15 S で同様に洗浄し、基質溶液（3 mM 3, 3', 5,
 5'-テトラメチルベンジジン及び 0.0 0 5 % 過酸化水
 素含有 0.2 M クエン酸緩衝液 pH 3.8）1 0 0 μ l を加え、
 室温で反応させた後、2 N 硫酸 1 0 0 μ l を加えて反応
 を停止させた後、4 5 0 nm の吸光度を測定した。
 20 交叉反応性（%）は次式により算出した。

$$\text{交叉反応性 (\%)} = \frac{\text{50\% 結合性 (吸光度 0.6 に相当する) を得るためのヒト S P-D 濃度 (50 ng/ml)}}{\text{50\% 結合性 (吸光度 0.6 に相当する) を得るための類似物質濃度 (ng/ml)}} \times 100$$

この結果、ヒトSP-Aに対する交叉反応性は0.2%以下であり、またラットSP-Dに対する交叉反応性は0.25%以下であった(図5, 表3)。

5 なお、同一試料を用いた前述のイムノブロッティングによる交叉反応性の解析では、両抗体(6B2及び7C6)は26~38 kDaのSP-Aに対しては全く反応性を示さず、SP-A画分中に微量混在するものと思われるSP-Dに反応することから、ヒトSP-Aに対する実際の交叉反応性はさらに低いものと考えられる。

10

表 3

類似物質	50%結合性を得る ための濃度(ng/ml)	交叉反応性 (%)
ヒトSP-D	50	100
15 ヒトSP-A	>25,000	<0.2
ラットSP-D	>20,000	<0.25

(C) 本発明のモノクローナル抗体は前述の通りヒトSP-Dに対して特異的に反応するものであり、そのうち固相化モノクローナル抗体(7C6)及びNakaneらの方法
20 (Immunoassays in the clinical laboratory. Alan R. Liss Inc., New York, 81, 1979)により調製した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化モノクローナル抗体(6B2)の組み合わせを用いることにより、ヒトSP-D
25 に対する特異的かつ高感度なサンドイッチELISAを

確立した。サンドイッチ E L I S A の基本操作方法は次の通りである。

モノクローナル抗体 (7 C 6) の P B S 溶液 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ を $100 \mu\text{l}$ ずつ 96 ウェルマイクロタイタープレート
5 レートの各ウェルに添加し、 4°C で 1 晩放置した後、P B S で 3 回洗浄した。1 % ウシ血清アルブミン (B S A) 含有 P B S $200 \mu\text{l}$ を各ウェルに添加し、さらに室温で 1 時間放置してブロッキングを施した。P B S で 3 回洗浄した後、ヒト S P - D の 0.5 % Triton X-
10 100 含有 P B S 溶液を $100 \mu\text{l}$ 添加し、室温で 1 晩放置した。P B S $200 \mu\text{l}$ で 3 回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化モノクローナル抗体 (6 B 2) の 0.5 % Triton X-100 及び 1 % B S A 含有 P B S 溶液 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ を $100 \mu\text{l}$ 加え、室温で 2 時
15 間反応させた。反応後、P B S で 3 回洗浄し、基質溶液 (0.3 mM 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン及び 0.005 % 過酸化水素含有 0.2 M クエン酸緩衝液 p H 3.8) $100 \mu\text{l}$ を加え、室温で 20 分反応させた後、2 N 硫酸 $100 \mu\text{l}$ を加えて反応を停
20 止させ、450 nm の吸光度を測定した。

① 検量線

Persson らの方法により調製した精製ヒト S P - D の 0.5 % Triton X-100 含有 P B S 溶液を標準物質としてサンドイッチ E L I S A を行った。その結果濃度
25 $3.13 \text{ ng} / \text{ml} \sim 200 \text{ ng} / \text{ml}$ の範囲において、

ヒトSP-D濃度依存性の良好な検量線が得られた（図6）。

② 添加回収試験及び希釈試験

本発明のサンドイッチELISAの基本性能を評価するために、ヒト羊水検体に対する精製ヒトSP-Dの添加回収試験及びヒト羊水検体の希釈試験を行った。添加回収試験においては、ヒト羊水検体に精製ヒトSP-Dの0.5% Triton X-100含有PBS溶液（0, 12.5, 25, 50 ng/ml）を加え、サンドイッチELISAにて測定した。その結果、精製ヒトSP-Dの良好な回収率（94.4～111.2%）が示された（表4）。一方、ヒト羊水検体を用いた希釈試験では、検体の希釈率とSP-D測定値との間に良好な直線性が示された（図7）。

表 4

試料	SP-D添加量 (ng/ml)	測定値 (ng/ml)	SP-D回収量 (ng/ml)	回収率 (%)
5	1	0	8.3	
		12.5	20.4	12.1
		25.0	31.9	23.6
		50.0	56.0	47.7
10	2	0	14.0	
		12.5	27.4	13.4
		25.0	38.4	24.4
		50.0	62.4	48.4
15	3	0	35.1	
		12.5	49.0	13.9
		25.0	59.8	24.7
		50.0	82.4	47.3

③ 交叉反応性

サンドイッチELISAのヒトSP-D類似物質に対する交叉反応性を調べるため、ヒトSP-A及びラットSP-D、さらに対照としてヒトSP-Dの段階希釈溶液を調製し、サンドイッチELISAにおける反応性を検討するとともに、次式によりそれぞれの交叉反応性を算出した。

$$\text{交叉反応性}(\%) = \frac{\text{50\% 結合性を得るためのヒトSP-D濃度 (60ng/ml)}}{\text{50\% 結合性を得るための類似物質濃度 (ng/ml)}} \times 100$$

この結果、ヒトSP-Aに対する交叉反応性は0.3%以下であり、またラットSP-Dに対する交叉反応性は

0.6%であった(表5)。

なお、同一試料を用いた前述のイムノブロッティングによる交叉反応性の解析では、両抗体(6B2及び7C6)は26~38kDaのヒトSP-Aに対しては全く反
5 応性を示さず、SP-A画分中に微量混在するものと思
われるヒトSP-Dに反応することから、ヒトSP-A
に対する実際の交叉反応性はさらに低いものと考えられ
る。

表 5

類似物質	50%結合性を得る ための濃度 (ng/ml)	交叉反応性(%)
ヒトSP-D	60	100
ヒトSP-D	>20480	<0.3
ラットSP-D	10240	0.6

実施例5 生体試料中のSP-D濃度の測定

実施例4(c)のサンドイッチELISAに従い、妊
婦羊水、肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液、さらに間
質性肺炎・肺胞蛋白症及びその他の呼吸器疾患を伴った
20 患者の血清中のSP-D濃度を測定した。

(A) 妊婦羊水中のSP-D濃度

妊娠26週~40週の妊婦羊水21検体中のSP-D
濃度を測定した結果、妊娠30週以上の羊水(13例)
では、妊娠30週以下の羊水(8例)に比べてSP-D
25 濃度が明らかに高値を示した(図8)。このことより、

羊水中 S P - D 濃度は胎児肺の熟成度を反映するとともに、羊水中 S P - D 濃度の測定は、I R D S を伴う胎児の診断に有用である可能性が示された。

(B) 気管支肺胞洗浄液中の S P - D 濃度

- 5 肺胞蛋白症患者（13例）、特発性肺線維症（I P F）、サルコイドーシス（S a r）及び健常人（13例）の気管支肺胞洗浄液について S P - D 濃度を測定した結果、肺胞蛋白症患者では、健常人に比べて明らかに S P - D 濃度が高値を示すことが示された（図 9）。このことより、気管支肺胞洗浄液中の S P - D 濃度の測定は、肺胞蛋白症患者の診断に有用である可能性が示された。なお、I P F および S a r では健常人の値とほぼ同じであった。

(C) 各種呼吸器疾患を伴う患者血清中の S P - D 濃度

- 15 特発性間質性肺炎、膠原病合併間質性肺炎、肺胞蛋白症、肺扁平上皮癌、肺腺癌、肺小細胞癌、サルコイドーシス、肺結核、肺気腫、肺炎、気管支喘息、気管支拡張症、汎細気管支炎等、各種呼吸器疾患を伴う患者、及び対照として健常人の血清中 S P - D 濃度を測定した。その結果、特発性間質性肺炎、膠原病合併間質性肺炎等の間質性肺炎及び肺胞蛋白症患者では、健常人に比べて明らかに高値を示した（図 10 及び 11）。このことより、血清中 S P - D 濃度の測定は、上記種々の疾患の鑑別診断に有用であることが示された。

- 25 実施例 6 免疫組織染色

外科的切除及び剖検によって得られた肺癌組織（腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌）及び他臓器癌組織をホルマリン固定、パラフィン包埋し、モノクローナル抗体を用いたABC法による免疫組織学的検討を行った。

- 5 すなわち、組織切片をキシレンをもちいて十分に脱パラフィン化した後、エタノール濃度を段階的に変えて水
和し、水洗した。次に0.3%過酸化水素含有メタノール
中に室温で30分間浸すことにより内因性ペルオキシダー
10 ゼ活性をのぞき、次いでPBSに5分間浸すことで洗
浄し、この洗浄を3回繰り返した。次に10%ウマ血清
含有PBSに室温で30分間浸すことでブロッキングを
施した後、PBSで適宜希釈したモノクローナル抗体ヒ
トSP-D抗体またはモノクローナル抗ヒトSP-A抗
15 体を滴下し、室温で30分間反応させた後PBSで同様
に洗浄した。次にビオチン化抗マウスIgG抗体（ベクタ
ー社製）を滴下し、室温で30分間反応させた後PBS
で同様に洗浄し、続いてABC試薬（ベクター社製）を
滴下し、室温で30分間反応させた。PBSで3回洗浄
20 した後、ペルオキシダーゼ基質溶液（ベクター社製）を
滴下して室温で反応させ、適当に発色した時点で水洗を
して発色反応を停止させ、切片を封入した。

- その結果、SP-Dは、肺腺癌の36例中25例及び
肺扁平上皮癌の5例中4例でそれぞれ陽性であり、他の
組織型の肺癌及び他臓器癌ではすべて陰性であった。ま
25 た、参考として行ったSP-Aに関しては、肺腺癌の3

6 例中 18 例が陽性であり、SP-D 及び SP-A の少なくとも一方が陽性なものは 36 例中 31 例であった。このことから、SP-D および SP-A に対する抗体を組み合わせて用いることにより陽性率が向上し、肺原発
5 の腺癌の診断により有用であることを確認した。なお、モノクローナル抗ヒト SP-D 抗体 (6B2) を用いて肺腺癌及び肺扁平上皮癌由来の肺組織を免疫組織染色させた時の典型的な例を図 12 及び図 13 に示す。

産業上の利用可能性

- 10 本発明のモノクローナル抗体は、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D に特異的に結合するものであり、このようなモノクローナル抗体を抗体試薬として使用することによりヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D を特異的に検出または測定することが初めて可能となったのである。
- 15 このため、本発明のモノクローナル抗体はヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D の機能解明のための一つのツールとして有用であり、また本発明の検出法または測定法及びそれに使用するキットは、IRDS、ARDS、肺胞蛋白症、間質性肺炎、肺腺癌、肺扁平上皮癌などの呼吸
20 器疾患の診断に有用なものと思われる。

請 求 の 範 囲

1. ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D に対して特異的に結合するモノクローナル抗体。

5 2. 下記の特徴を有する、請求の範囲第 1 項記載のモノクローナル抗体。

① 特異性

ヒト由来の他の抗原性物質とは実質的に反応せず、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D のみに反応する。

10 ② 反応性

抗体の濃度に依存してヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D と反応する。

③ 交叉性

15 ヒト由来の肺サーファクタントアポ蛋白 A、同 B および同 C とは実質的に反応しない。

④ 種特異性

ラット由来の肺サーファクタントアポ蛋白 D とは実質的に反応しない。

20 3. 請求の範囲第 1 項記載のモノクローナル抗体を測定試薬として使用することを特徴とする、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D の測定法。

4. 請求の範囲第 1 項記載のモノクローナル抗体を 1 つの構成試薬として含有してなる、ヒト肺サーファクタントアポ蛋白 D を測定するためのキット。

25 5. 標識化した請求の範囲第 1 項記載のモノクローナ

ル抗体を抗体試薬として使用することを特徴とする、ヒト肺組織中におけるヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dの存在を検出するための方法。

6. 請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体を1
5 つの構成試薬として含有してなる、ヒト肺組織中におけるヒト肺サーファクタントアポ蛋白Dの存在を検出するためのキット。

7. 生体試料中のヒト肺サーファクタントアポ蛋白D
を測定または検出し、呼吸器疾患の診断に利用するための
10 のキット。

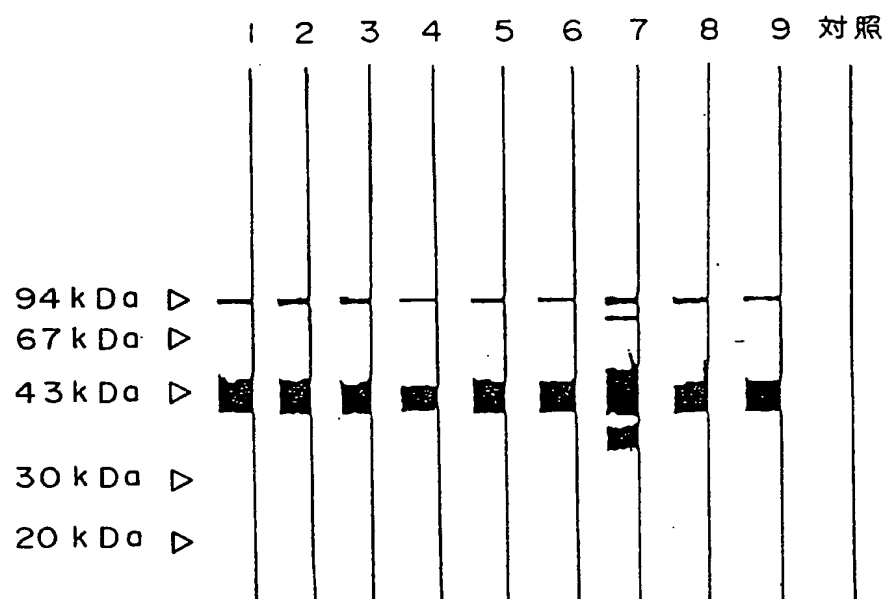
8. ヒト肺サーファクタントの測定または検出に、請求項1記載のモノクローナル抗体を使用する、請求項8記載のキット。

9. 生体試料が、羊水、気管支肺胞洗浄液、血清、肺
15 組織から選ばれたものである、請求項8記載のキット。

10. 呼吸器疾患が、IRDS、ARDS、肺胞蛋白症、間質性肺炎、肺腺癌、肺扁平上皮癌から選ばれたものである、請求項8記載のキット。

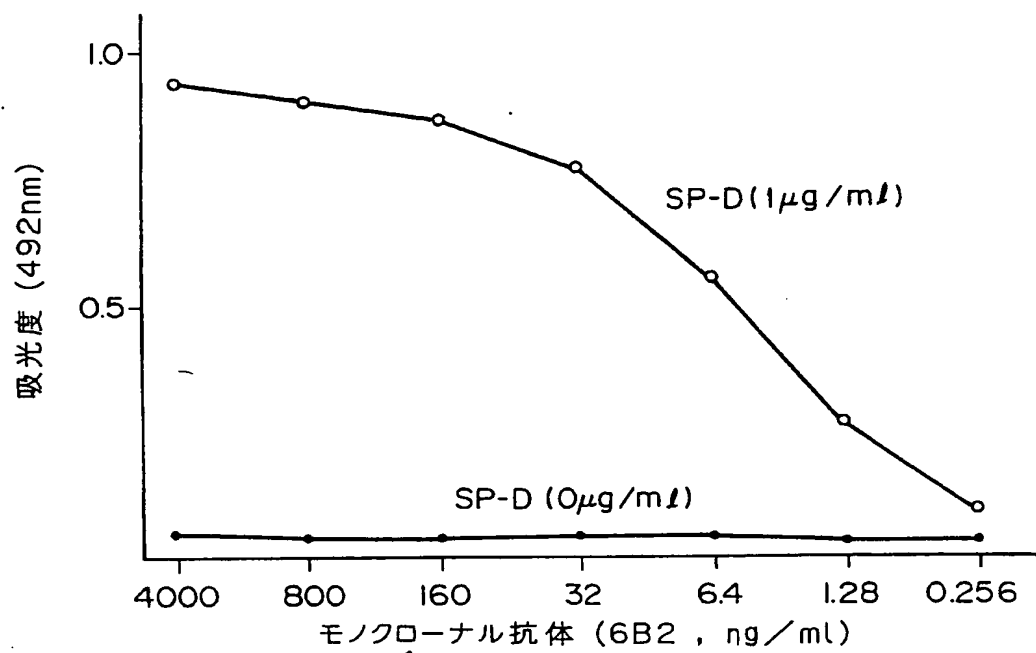
1/13

FIG. 1



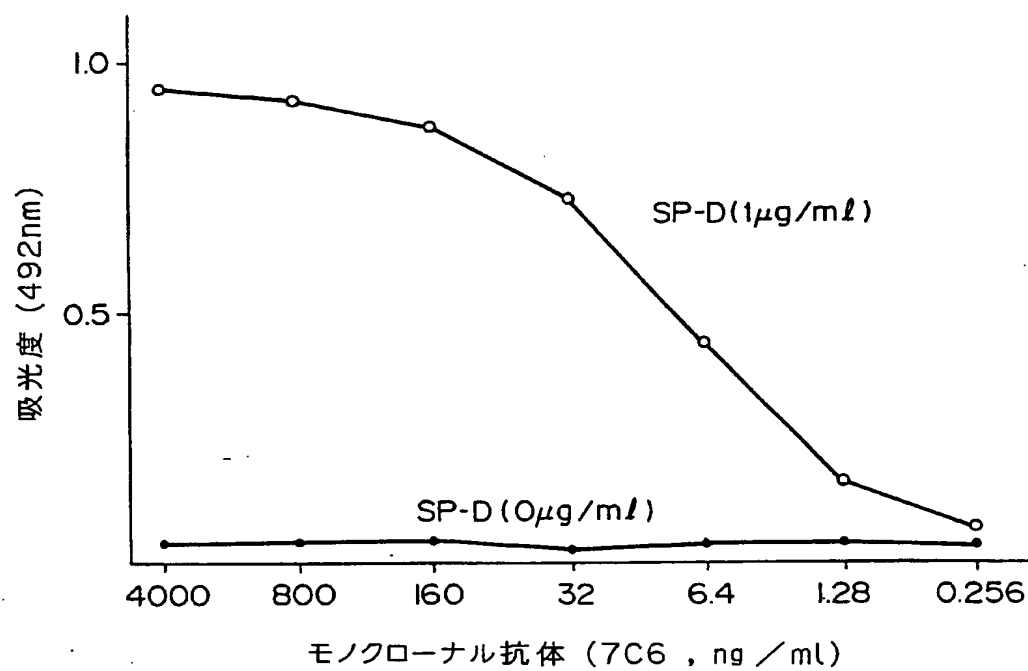
2/13

FIG. 2



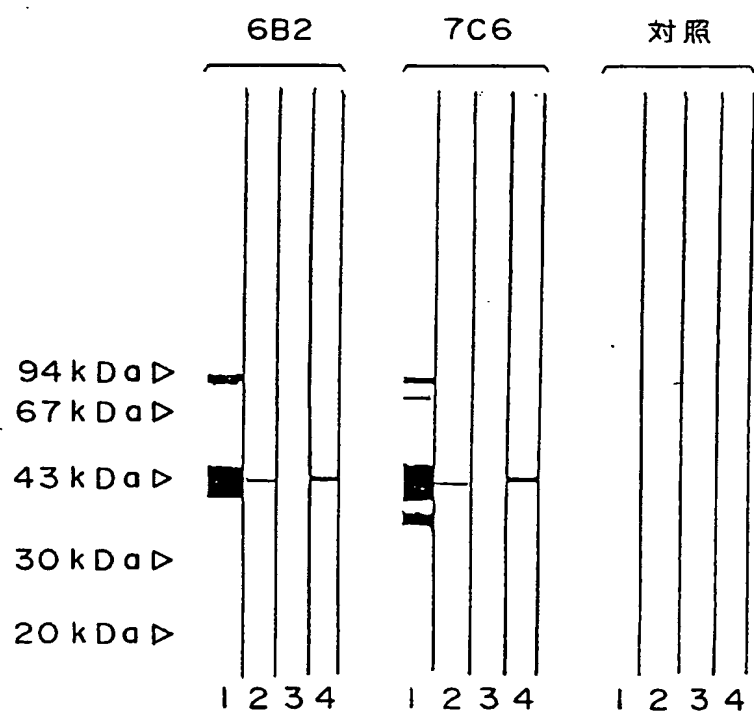
3/13

FIG. 3



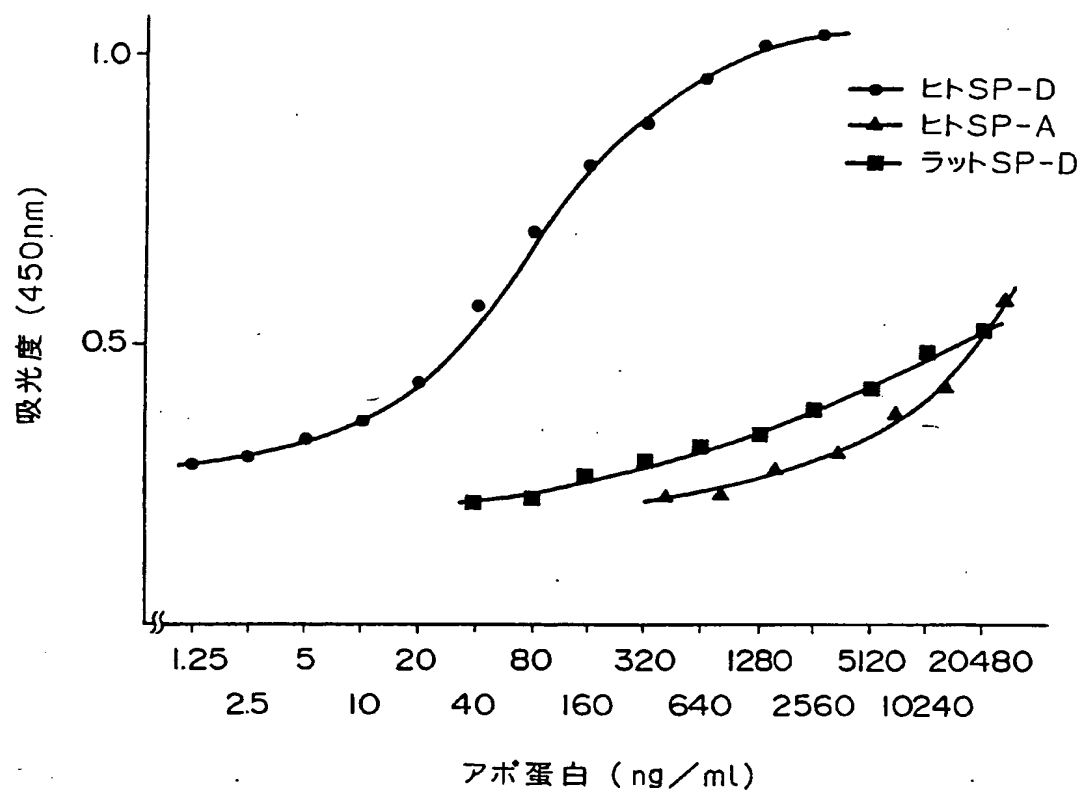
4/13

FIG. 4



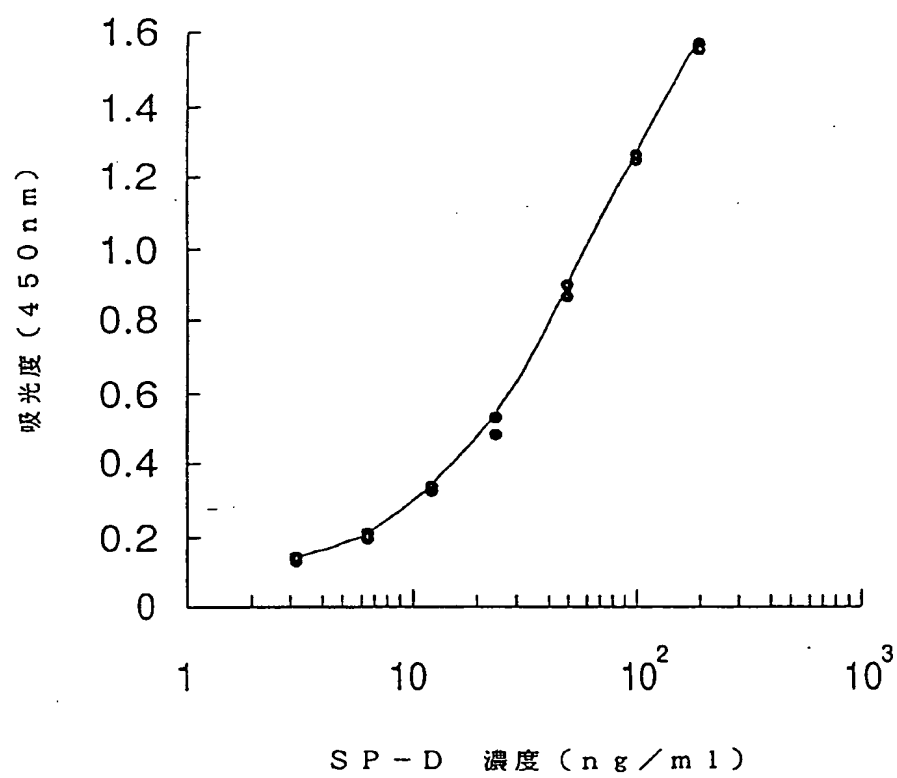
5/13

FIG. 5



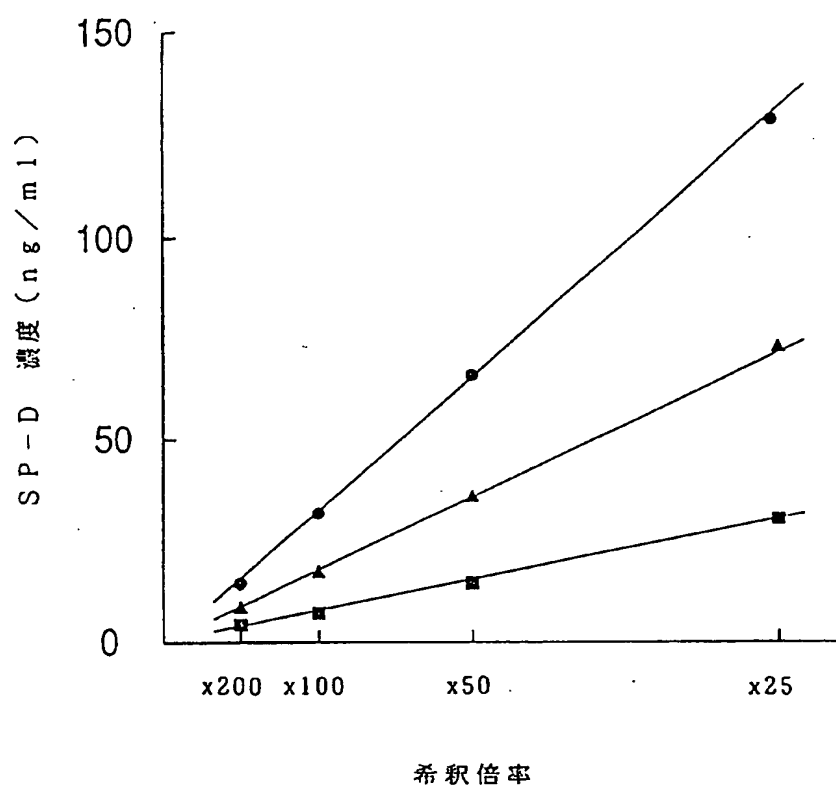
6/13

FIG. 6



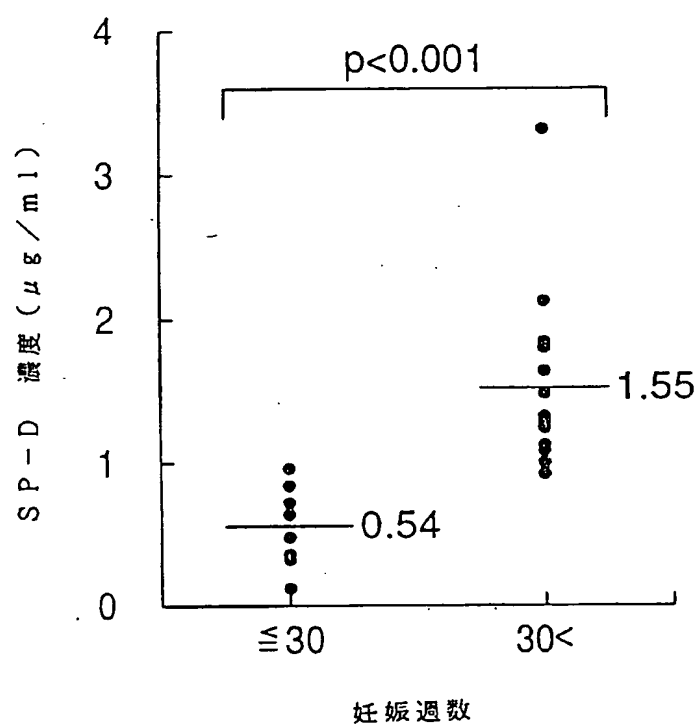
7/13

FIG. 7



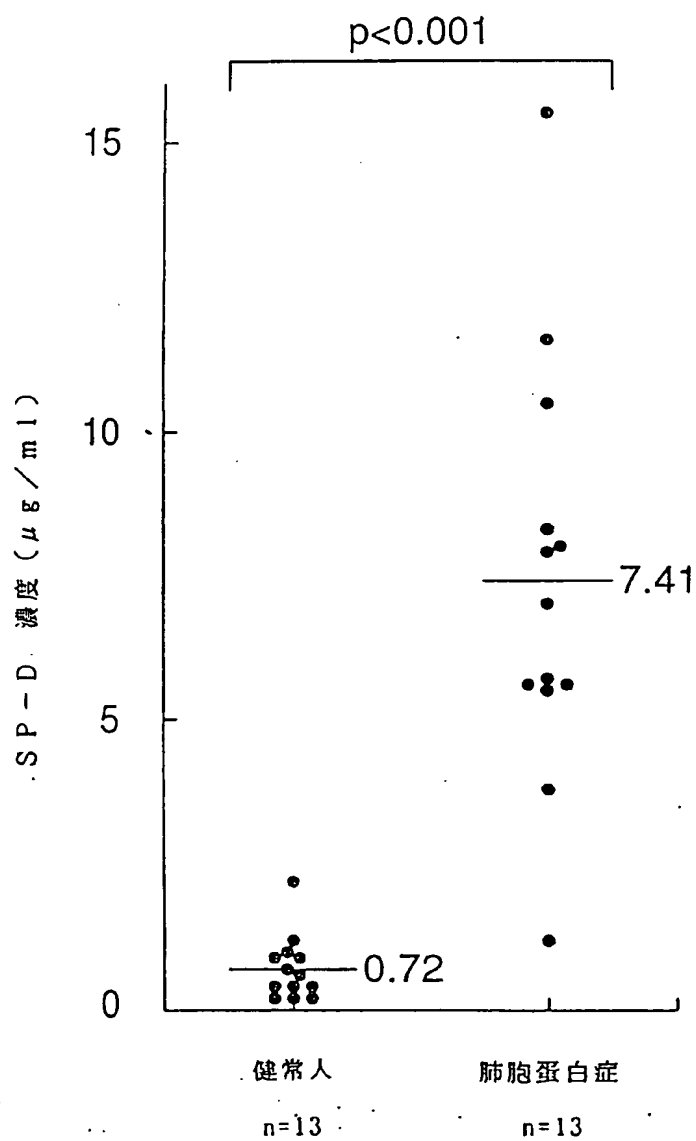
8 / 13

FIG. 8



9/13

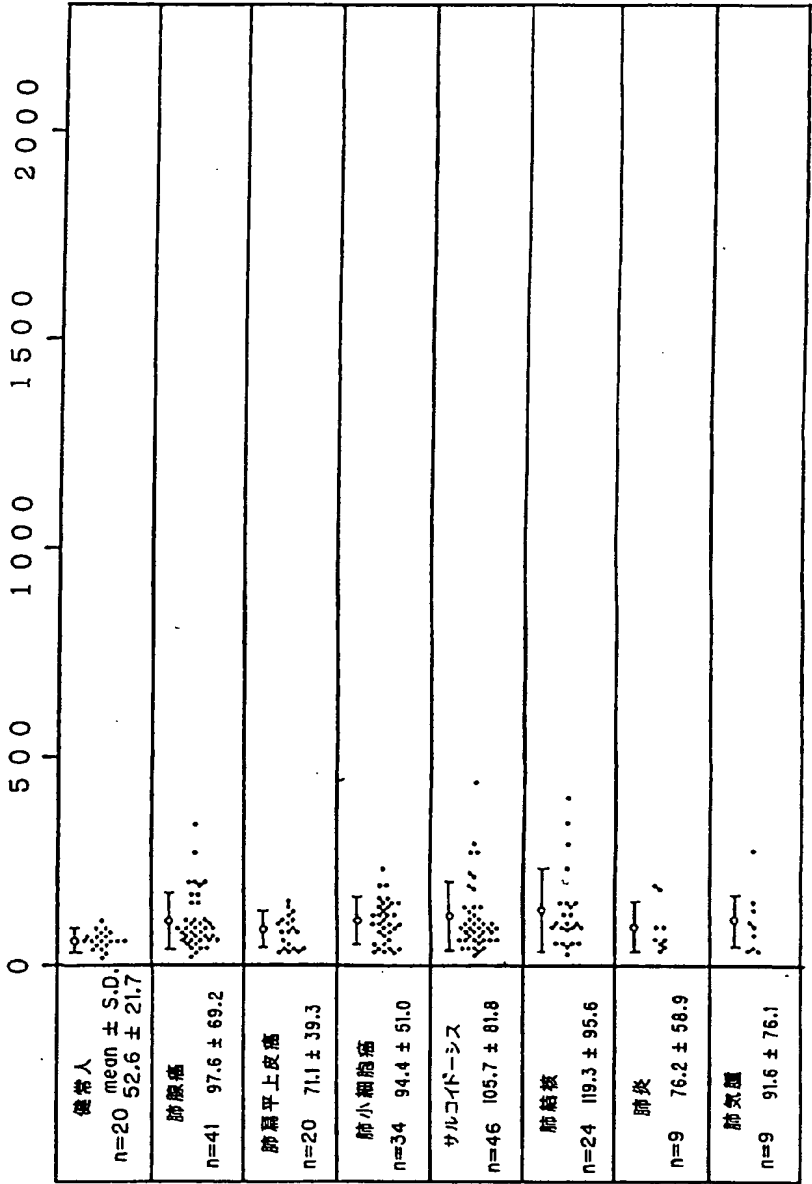
FIG. 9



10/13

FIG. 10

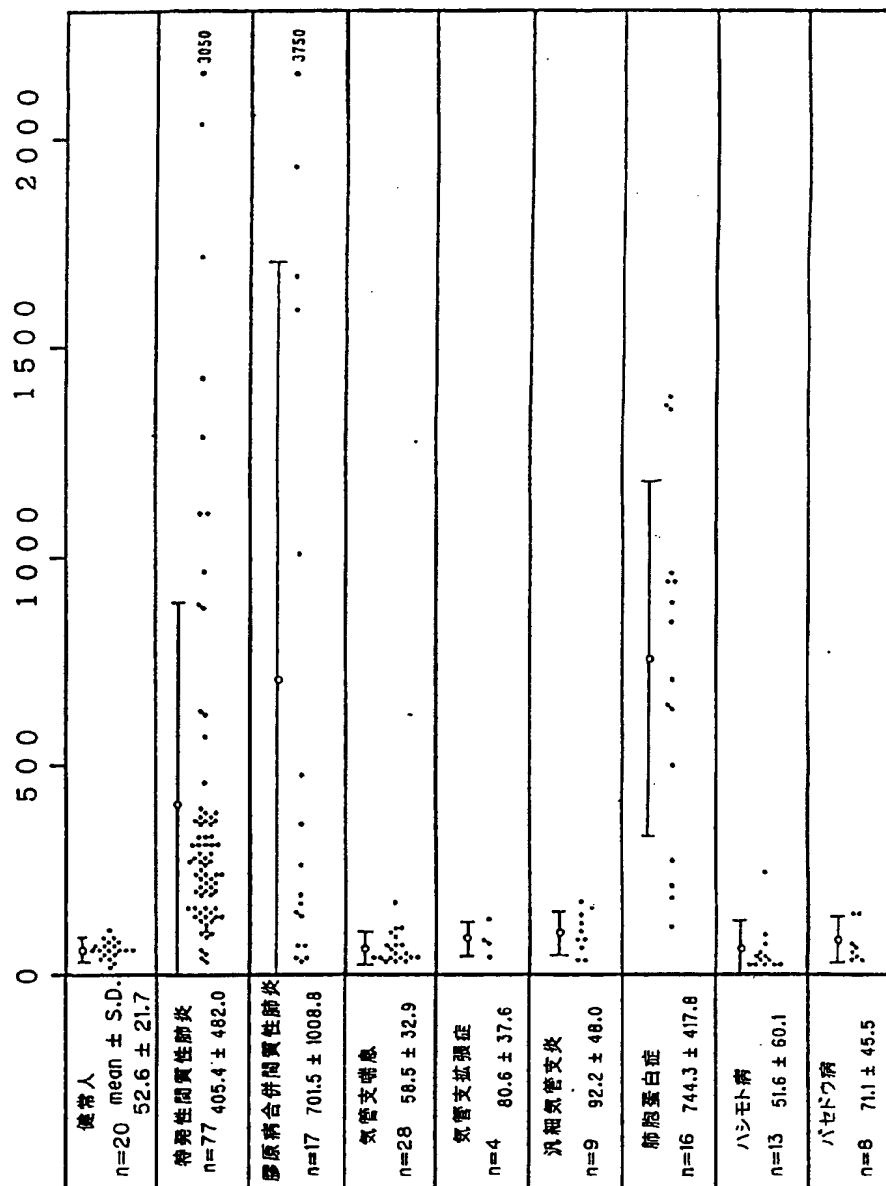
SP-D 濃度 (ng/ml)



11/13

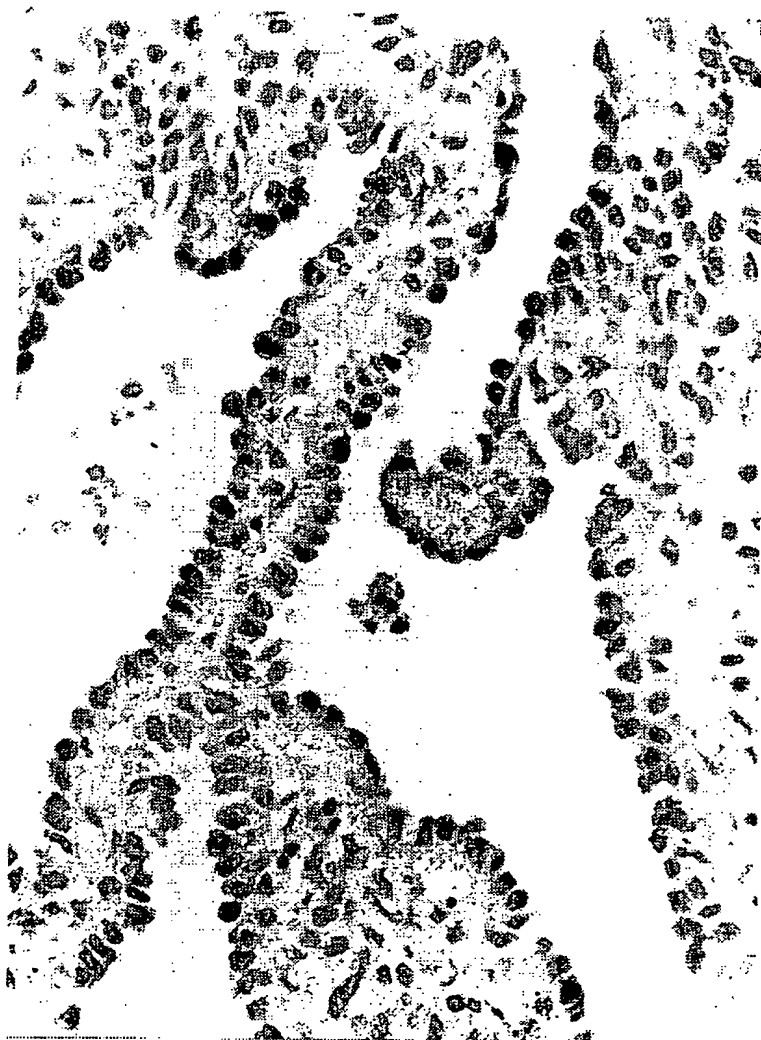
FIG. II

SP-D 濃度 (ng/ml)



12/13

FIG. 12



13/13

FIG. 13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/00768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C12P21/08, G01N33/577, 33/53
 //C12N15/06 (C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12P21/08, C12N15/06-15/08,
 G01N33/53, 33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 290, No. 1, (1991), K. Rust et al., "Human surfactant protein D:SP-D contains a C-type lectin carbohydrate recognition domain" p. 116-126	1, 3-10 2
Y A	JP, A, 61-277699 (Teijin Ltd.), December 8, 1986 (08. 12. 86), (Family: none)	1, 3-10 2
Y	JP, A, 62-64956 (Teijin Ltd.), March 24, 1987 (24. 03. 87), (Family: none)	3-10
Y	JP, A, 4-9665 (Teijin Ltd.), January 14, 1992 (14. 01. 92), (Family: none)	3-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 3, 1993 (03. 09. 93)

Date of mailing of the international search report

September 21, 1993 (21. 09. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁸ C12P21/08, G01N33/577, 33/53 //C12N15/06 (C12P21/08, C12R1:91)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁸ C12P21/08, C12N15/06-15/08, G01N33/53, 33/577		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	Archives of Biochemistry and Biophysics, 第290巻, 第1号, (1991), K. Rust et al. "Human surfactant protein D:SP-D contains a C-type lectin carbohydrate recognition domain" p. 116-126	1, 3-10 2
Y A	JP, A, 61-277699 (帝人株式会社) 8. 12月. 1986 (08. 12. 86), (ファミリーなし)	1, 3-10 2
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
03. 09. 93		21.09.93
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生 4 B 8 2 1 4 電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, A, 62-64956 (帝人株式会社) 24. 3月. 1987 (24. 03. 87), (ファミリーなし)	3-10
Y	JP, A, 4-9665 (帝人株式会社) 14. 1月. 1992 (14. 01. 92), (ファミリーなし)	3-10

式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)